

**Recherches cyto-physiologiques sur la sporogénèse  
de *Coprinus congregatus* Bull. ex Fr. :**  
**Introduction à l'étude du déroulement de la méiose  
en rapport avec les conditions lumineuses et thermiques.**

G. MANACHERE et Y. BASTOUILL-DESCOLLONGES\*

RÉSUMÉ. — Le comportement nucléaire des cellules hyméniales et les stades physiologiques de développement des carpophores de *Coprinus congregatus* Bull. ex Fr. sont déterminés corrélativement par les alternances «Lumière - Obscurité».

Le développement des primordiums présente des phases successives à la température de référence de 25°C : — 1ère phase photo-stimulée (2,5 à 3,5 jours); — phase photo-inhibée pour l'accomplissement de laquelle l'obscurité nécessaire et suffisante (ex : 4 à 5 heures) peut être remplacée par un abaissement thermique (ex. : 6 heures à 10°C); — 2ème phase photo-stimulée (quelques heures); — une dernière phase photo-indifférente.

A l'échelle microscopique les événements nucléaires sont étudiés de façon à permettre une étude statistique du phénomène méiotique, et une étude comparée à l'évolution cytotologique et morphogénétique des carpophores.

Il a été établi que : — la lumière donnée en fin de 1ère phase photo-stimulée est nécessaire à l'initiation de la méiose; — un abaissement thermique peut lever le blocage de la méiose au stade caryogamie, résultant du non-accomplissement de la phase photo-inhibée; que cette phase photo-inhibée soit réalisée par abaissement thermique ou par obscurcissement, la dynamique de la méiose reste comparable.

SUMMARY. — The nuclear behaviour of hymenial cells and the physiological stages of development of *Coprinus congregatus* fruit-bodies ■ correlatively determined by daily «light» and «dark» periods.

Primordia development was characterized at a standard temperature of 25°C by the following successive phases : — ■ first photo-stimulated phase (2,5 to 3,5 days); — a photo-inhibited phase (4 or 5 hours of darkness minimum); this dark period can be substituted by a lowering of the temperature (e. g. : 25 to 10°C during 6 hours); — ■ second photo-stimulated phase (few hours); — a photo-indifferent phase.

\* Université Lyon I - Département de Biologie Végétale et Laboratoire de Mycologie associé au CNRS n° 44, Bâtiment 405, 43 Bd du 11 novembre 1918 - 69622 Villeurbanne Cedex France.

At the microscopical level nuclear events were studied in such a way to allow a statistical analysis of meiosis, as well as a comparison of cytological and morphological development of the fruit-bodies.

It has been established that : — light provided at the end of first photo-stimulated phase is necessary for meiosis initiation; — lowering the temperature suppressed meiotic arrest at the «nuclear fusion» stage in the absence of the photo-inhibited phase. The kinetics of meiosis were found to be similar whether darkness or a lower temperature was given to satisfy the photo-inhibited phase.

## I. — INTRODUCTION

Au cours des deux dernières décennies, de nombreux travaux ont été conduits, afin de préciser les déterminismes de la morphogenèse des champignons. Nous avons tenté récemment de dresser un état de l'avancement de ces recherches pour ce qui concerne les Basidiomycètes (MANACHERE 1978, 1980; MANACHERE et al., sous presse). Il ressort de ces mises au point que, actuellement, certains axes sont privilégiés par une majorité de chercheurs : ainsi ceux concernant la biochimie métabolique de la différenciation des carpophores, depuis l'apparition de leurs primordiums à partir du mycélium originel jusqu'à leur maturation, celle-ci concrétisée en particulier par la formation de basidiospores mûres et leur projection.

Ces recherches nécessitent, en pratique, une bonne «domestication» des espèces étudiées : ainsi, l'analyse de la composition d'un carpophore, au plan biochimique, n'a de sens que si le chercheur connaît l'état physiologique de celui-ci, et peut en outre avoir à sa disposition un nombre suffisant d'échantillons au stade correspondant. Cette maîtrise du matériel biologique reste exceptionnelle dans le cas de la plupart des Basidiomycètes. Quand cette maîtrise est possible, les chercheurs se bornent le plus souvent à prendre pour référence des stades de développement physiologiques reconnaissables, plus ou moins aisément, macroscopiquement, par leurs éventuelles caractéristiques morphologiques.

Or tout carpophore de Basidiomycètes (qualifié de «sporophore» par les scientifiques anglo-saxons) est normalement producteur de basidiospores. Son degré d'évolution doit donc pouvoir être apprécié par celui de sa sporogenèse et l'on devrait, par voie de conséquence, être en mesure de préciser les stades physiologiques, usuellement définis macroscopiquement, par des observations microscopiques de l'état d'avancement de la sporogenèse : ceci implique la recherche d'un complément d'information à l'échelle microscopique.

Les influences respectives de la lumière et de l'obscurité sur la sporogenèse au niveau de jeunes basides de *Coprinus congregatus* ont été reconnues de longue date (MANACHERE 1968). La régulation du phénomène par le photopériodisme a été démontrée. La portée générale de nos observations a été établie par plusieurs auteurs se consacrant à d'autres espèces de Coprins. En particulier, le «blocage» de la méiose au stade «noyau de fusion» sous éclaircissement ininter-

rompu, que nous avons observé pour la première fois au niveau de basides de carpophores de *C. congregatus* développés à 25°C (MANACHERE 1968), ■ été confirmé ultérieurement dans le cas de carpophores de *Coprinus «lagopus»* à 35°C (LU 1972) et de *Coprinus macrorhizus* à 28°C (KAMADA et al. 1978).

Dans nos conditions expérimentales usuelles (cf. ci-après, «cultures des mycéliums fructifères»), après leur bouturage, les cultures de *Coprinus congregatus* sont soumises généralement à un pré-séjour à l'obscurité (P.C.O. = pré-culture à l'obscurité). Au cours de celui-ci, la croissance végétative s'effectue, à l'abri des radiations lumineuses qui seraient susceptibles d'induire la fructification.

A l'issue de la P.C.O., à la température de 25 ± 1°C, et sous l'éclairement de référence, des cultures éclairées sans interruption (régime lumineux quotidien dit «L,L») ou à raison de 12 heures par jour (régime lumineux quotidien dit «L,O» ou «L,D» - alias «lumière, obscurité» ou «light, darkness» - «12,12») portent le plus souvent après 3,5 à 4,5 jours des primordiums dits au «stade de sensibilité à l'obscurité» (stade - 36 h dans nos conditions expérimentales). En pratique, ce stade témoigne de l'achèvement d'une «première phase photo-stimulée» au cours de laquelle la lumière a été nécessaire à la naissance et au développement des primordiums (MANACHERE 1970).

Nous avons établi que, à ce stade de sensibilité à l'obscurité, et toujours à la température de 25°C, un obscurcissement temporaire est indispensable pour que les carpophores poursuivent leur développement (phase photo-inhibée); en particulier pour que leurs stipes s'allongent normalement et que la maturité générale des chapeaux s'effectue, particulièrement pour ce qui concerne la sporogénèse. Un obscurcissement d'une durée de 12 heures est alors efficace, à condition d'être suivi d'un nouvel éclaircissement convenable en intensité et durée, nécessaire à l'accomplissement d'une «seconde phase photo-stimulée» (MANACHERE 1970). En pratique, à 25°C, un obscurcissement d'une durée de 5 heures est «inducteur à 100 %» (ROBERT et DURAND 1979).

Diverses expériences conduites dans le cadre de l'étude des interactions des facteurs lumière et température sur la fructification ont permis d'établir que l'obscurité «nécessaire et suffisante» à 25°C peut être remplacée par un abaissement de température convenable, les primordiums au stade de sensibilité à l'obscurité étant alors maintenus à la lumière. C'est ainsi qu'un abaissement de la température de 25 à 10°C pendant 12 heures à compter de ce stade est pleinement efficace et compense le non obscurcissement (ROBERT 1971). En pratique, un abaissement de température de 25 à 10°C pendant 6 heures est «inducteur à 100 %» (ROBERT et DURAND 1979). Au demeurant, quand obscurité et basse température interviennent simultanément, la basse température amplifie l'induction liée à l'obscurcissement, et ceci d'autant mieux qu'elle est donnée à la fin de la période d'induction (DURAND et ROBERT 1980).

Nos données initiales sur la cyto-physiologie des carpophores de *C. congregatus* seront rappelées et précisées ci-après, compte-tenu d'observations plus récentes. L'apport de ces résultats à une meilleure connaissance des déterminismes de la morphogénèse de ces carpophores sera envisagé.

## II. — MATÉRIEL ET MÉTHODES

### 1) CULTURE DES MYCÉLIUMS FRUCTIFÈRES

Les cultures de *Coprinus congregatus* Bull. ex Fr. sont faites selon notre technique usuelle (cf. MANACHERE 1970), en tubes à essais, par confrontation de deux mycéliums compatibles d'origine monosperme, sur notre milieu semi-synthétique type n° 3 modifié (g/l) : malt (Cristomalt) Difal : 10 g; hydrolysate de caséine (Fluka) : 0,7 g;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  : 0,2 g;  $(\text{MgCO}_3)_4\text{Mg}(\text{OH})_2 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$  : 0,125 g;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  : 0,1 g;  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$  : 0,05 g; gélose (Serlabo) : 12 g.

Les conditions générales de culture ont été rappelées ■ introduction. Sauf indications contraires, les cultures sont maintenues dans une pièce climatisée, à la température de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  soit dans une enceinte obscure, soit sous éclairage artificiel. Dans ce dernier cas, la lumière est donnée par des tubes fluorescents Mazdafluor « lumière du jour de luxe » (énergie lumineuse au niveau des cultures : environ  $30 \mu\text{W}\cdot\text{cm}^{-2}$ , soit sensiblement 150 lx).

### 2) OBSERVATIONS CYTOLOGIQUES

#### a. - Coloration des noyaux par l'hématoxyline ferrique :

Des fragments de chapeaux prélevés sur des carpophores aux différents stades à étudier sont fixés dans le mélange de Hollande (BOIDIN 1954). Après 8 jours ou plus de fixation, le matériel est rincé abondamment, déshydraté et inclus dans la paraffine fondue à  $60^\circ\text{C}$ . Ces fragments sont alors coupés au microtome, à 5  $\mu\text{m}$  d'épaisseur. Les coupes sériées sont étalées sur lame de verre et, après séchage, déparaffinage et réhydratation, elles sont hydrolysées dans une solution de HCl N, à  $60^\circ\text{C}$ , pendant 10 minutes, puis mordancées dans l'alun de fer ammoniacal (en solution aqueuse à 5 %) et finalement colorées par immersion dans l'hématoxyline ferrique (la solution employée est obtenue par dilution au 1/10e dans l'alcool à  $70^\circ$  d'une solution mère - cette dernière préparée en dissolvant de l'hématoxyline ferrique dans de l'alcool à  $95^\circ$  à raison de 10 g/100 ml). Après 3 jours, la coloration est régressée par l'alcool picriqué; les coupes sont ensuite déshydratées et montées dans une goutte de Baume du Canada.

Cette méthode ■ été retenue car elle présente l'avantage de permettre un comptage complet des basides à un niveau choisi des lamelles (dans leur moitié inférieure). Cette étude a été effectuée pour chaque stade sur 6 exemplaires différents de primordiums; chacun d'entre eux ■ été étudié au niveau d'une lamelle et sur tout le profil de celle-ci; ainsi dans chaque comptage la différence de maturation des basides existant entre la base des lames et leur arête est prise en compte de manière identique. Le pourcentage des basides correspondant à un état nucléaire précis est donc calculé pour chaque stade de développement des carpophores à partir de 6 comptages différents. Ceci permet l'étude statis-

tique de la méiose à ses diverses étapes (fig. 2 et 3).

Cette technique de coloration présente néanmoins des limites : en particulier, elle ne permet pas une observation fine des divers états chromosomiques de la prophase I de la méiose.

#### b. - Coloration des noyaux par l'hématoxyline propionique :

La méthode des étalements de LU (1967) - modifiée par ZICKLER (1973) - après coloration à l'hématoxyline propionique, présente l'avantage de rendre l'observation des chromosomes plus aisée, leur image apparaissant bien contrastée sur un cytoplasme homogène et transparent.

Le fixateur utilisé est un mélange butanol - acide acétique glacial - acide chromique à 2 %, dans les proportions 9/6/2 (v/v). Après huit jours de fixation, les fragments de chapeaux sont hydrolysés dans HCl N à 70°C pendant 10 minutes; l'hydrolyse est arrêtée par refroidissement très rapide dans la glace.

Un fragment de lamelle hyméniale est séché, dilacéré pendant 30 secondes sur une lame de verre dans 2 gouttes d'acétate de fer (préparation à partir d'une solution saturée d'acétate de fer basique purifié, par dilution à 3-4 % dans l'acide acétique à 45 %). Deux gouttes d'hématoxyline propionique à 2 % sont déposées sur la lame et mélangées lentement au mordant (le colorant qui ■ vieillit est d'autant plus efficace). Le matériel est étalé sur la lame par légère pression sur la lamelle couvre-objet. L'observation est faite au contraste de phase.

### III. - RÉSULTATS

#### 1) ÉVOLUTION DE LA MÉIOSE ET DE LA SPOROGENÈSE SOUS RÉGIME PHOTOPÉRIODIQUE (L,D : 12,12), A 25°C. (Fig. 2)

Dans ces conditions expérimentales, la plupart des cultures portent des carpophores mûrs (stade Oh) au début de la 6ème photopériode, soit donc 5 jours après la fin du pré-séjour à l'obscurité. La morphologie des primordiums aux débuts et fins des photopériodes permet très généralement de prévoir dans quel délai ils atteindront leur maturité et donc de définir très précisément des stades - 72 h, - 60 h, etc. (MANACHERE 1970).

Nos comptages ont permis de constater que les jeunes basides ont encore 2 noyaux aux stades - 48h et - 36h. A - 48h les noyaux sont de petite taille; entre - 48h et - 36h, les basides en grossissant passent de la forme cylindrique à la forme en massue, les noyaux grossissent, la chromatine s'organise, les chromosomes semblent s'individualiser, les noyaux se rapprochent. A - 36h la fusion nucléaire paraît imminente pour les basides de plus grande taille. La caryogamie débute une fois atteint le stade - 36h et se poursuit au cours de la période obscure séparant les stades - 36h et - 24h, période obscure dont on sait qu'elle est ici nécessaire et suffisante à une maturation « normale » des car-

pophores, tant au plan de la morphogenèse que celui de la sporogenèse. Plus précisément, il apparaît que, au stade — 24h, les basides les plus grosses — c'est à dire celles qui émergent et constituent la «1ère génération» — sont au stade «noyau de fusion». Par contre les plus jeunes contiennent encore 2 noyaux, mais proches l'un de l'autre et dans lesquels les chromosomes commencent à s'individualiser, montrant bien que la fusion est imminente (Fig. 1, f - g). Ainsi à ce stade — 24h environ 50 % des basides renferment un seul noyau diploïde ou noyau de fusion. Toutes les basides présentent finalement un noyau de fusion entre — 20h et — 16h. Les stades méiotiques bi- puis tétranucléés sont observés dans les 4 heures qui suivent. Il est possible d'estimer la durée de la Prophase I à 18 heures maximum pour les basides de la 1ère génération et à 8 heures maximum pour les basides les plus jeunes. Ce décalage dans l'évolution des basides se retrouve après le stade — 12h dans la taille et la pigmentation des spores.

Au stade — 12h, de nombreuses basides ont 4 noyaux et montrent des stérigmates, dont la plupart n'ont pas encore d'ébauche de spore à leur extrémité. La sporogenèse proprement dite se produit au cours de la période obscure séparant les stades — 12h et 0h, période dont il convient de rappeler qu'elle peut être remplacée par une période éclairée d'égale durée sans préjudice apparent pour le développement normal des carpophores (MANACHERE 1970).

Au stade — 8h, les stérigmates de la plupart des basides sont porteurs de spores, dans la majorité des cas peu colorées et non nucléées.

Au stade — 4h la coloration des spores s'est accentuée, les 4 noyaux de chaque baside ont généralement franchi les stérigmates, gagnant chacun respectivement une spore. Suite à une division mitotique, les spores mûres de *C. congregatus* ont 2 noyaux, comme celles de la plupart des Agaricales chromo-

Fig. 1. : Évolution nucléaire depuis le stade «2 noyaux préméiotiques» jusqu'au stade «tétrade postméiotique». (x 1400).

a - b : «stade — 48h» ; basidioles cylindriques à 2 noyaux compacts.

c - d : «stade — 36h» obtenu en 12,12 : les basides prennent la forme de massue; dans les noyaux dont la fusion est imminente, la chromatine s'organise.

e : «stade — 36h» obtenu en LL (lumière continue) : la caryogamie a débuté dans quelques basides.

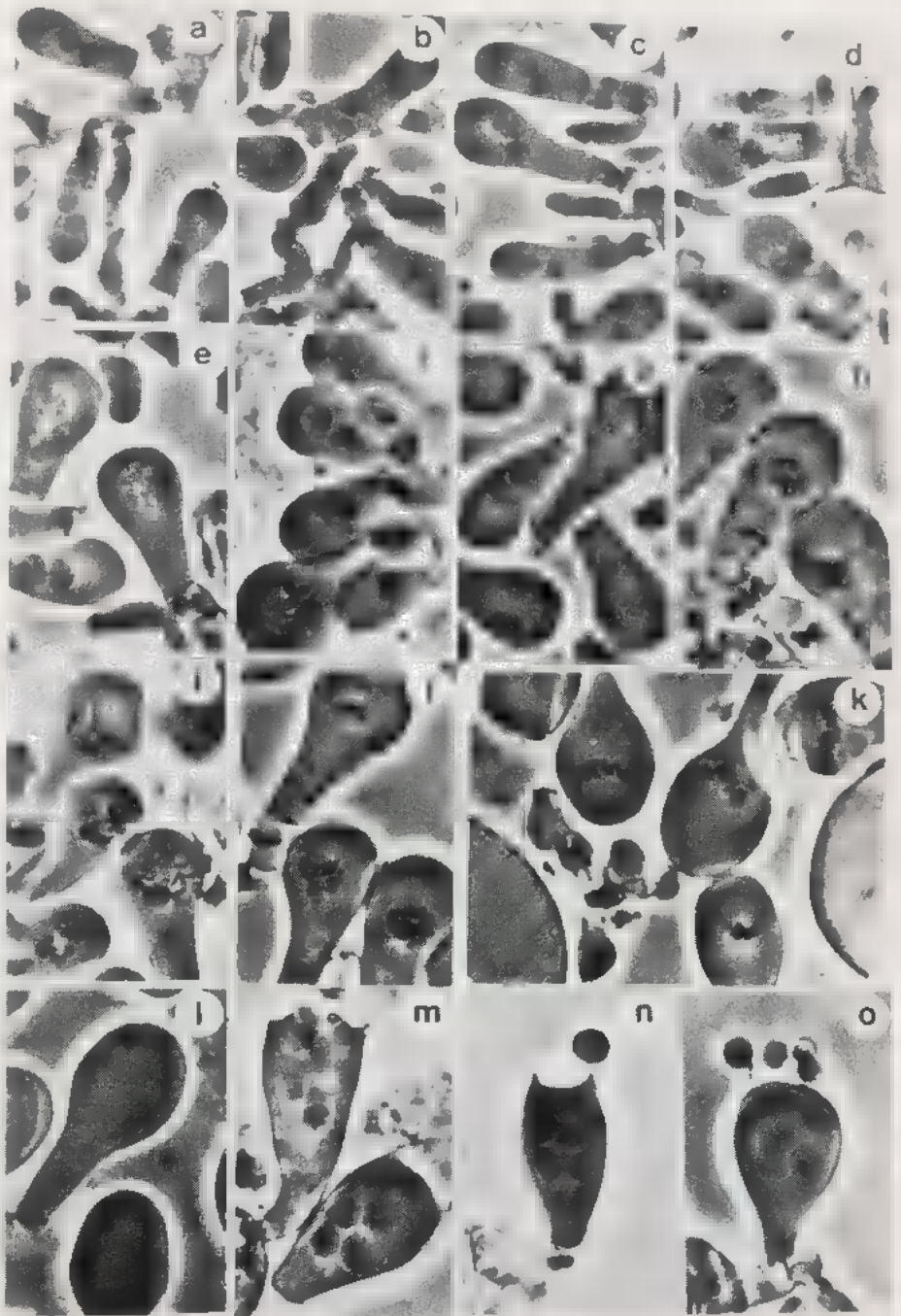
f - g - h : «stade — 24h» : les basides les plus développées présentent un noyau de fusion à l'état prophase I, les plus jeunes ont 2 noyaux sur le point de fusionner.

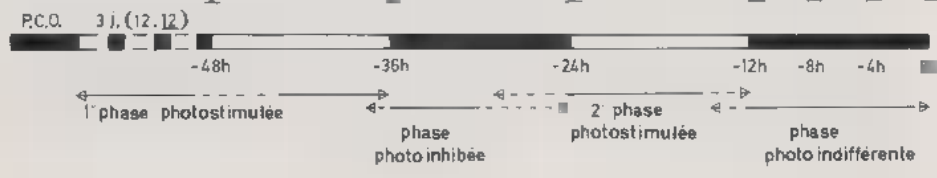
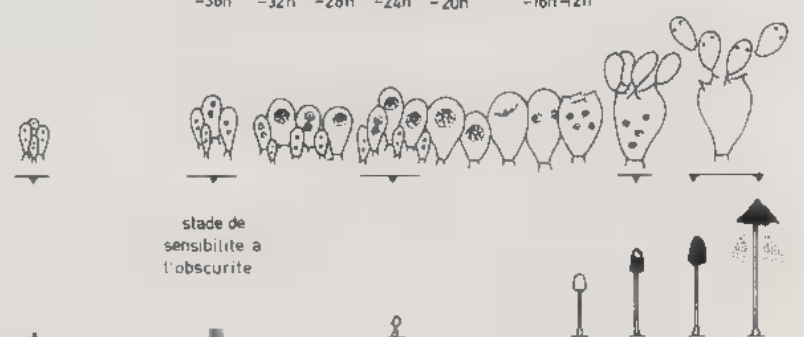
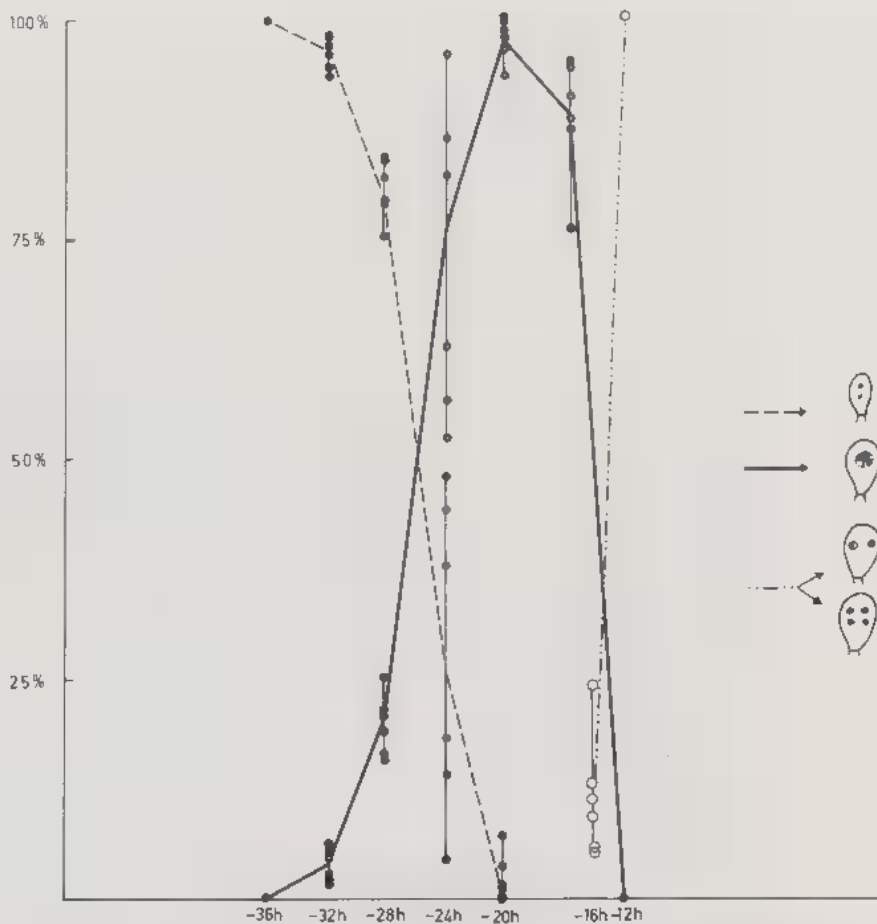
i - j : «stade — 18 à — 20h» : toutes les basides possèdent un noyau méiotique à l'état prophase I.

k - l : «stade — 16h» : tous les stades nucléaires entre la métaphase et la télophase I peuvent être observés.

m - n - o : «stade — 12 à — 8h» : la tétrade de noyaux formés à la fin de la 2ème division de méiose va de pair avec l'apparition des stérigmates et la naissance des spores.

Remarque : A — 10h les spores n'ont pas encore atteint leur taille adulte (environ 12 x 6 µm). A — 8h la pigmentation des spores a commencé. La sporogenèse se poursuit par la migration des noyaux dans les spores, aux environs de — 4h. Dans chaque spore se produit alors une mitose qui aboutit à la formation de spores binucléées. Les basides ne gardent donc aucun noyau résiduel.







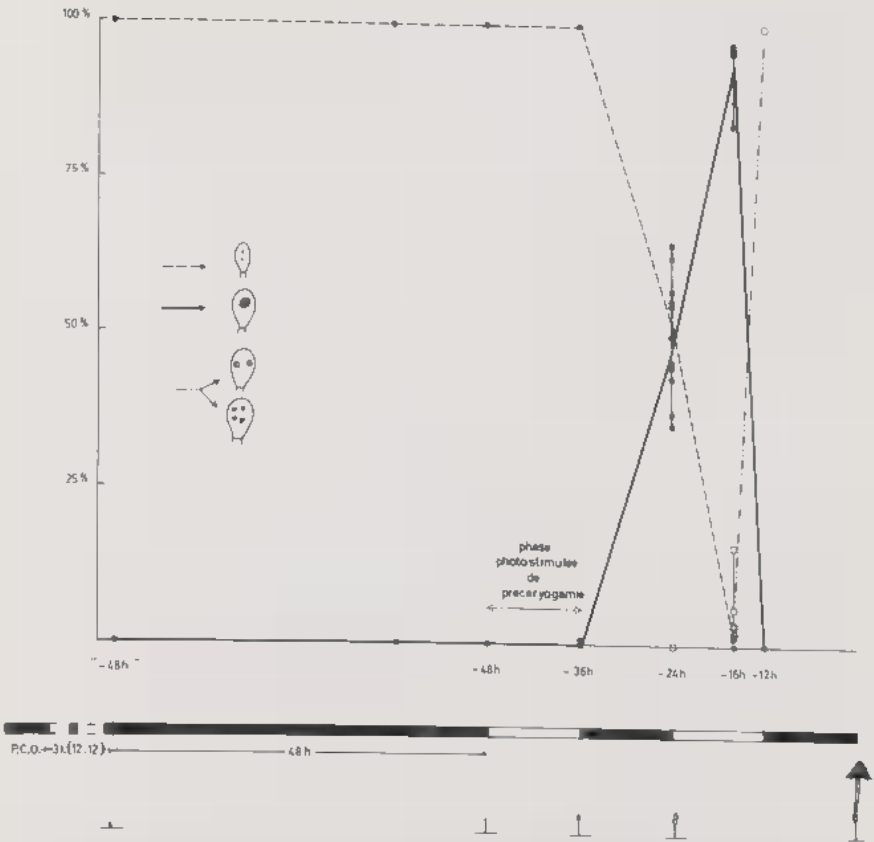


Fig. 2 : Évolution de la méiose et de la sporogénèse sous régime photopériodique (L, O : 12,12) à 25°C.

- Représentation statistique de l'évolution de la méiose entre le stade de sensibilité à l'obscurité et l'obtention des 4 noyaux méiotiques.
- Étude comparée des évolutions cytologique et morphogénétique des carpophores de *Coprinus congregatus*.

Fig. 3 : Étude statistique de l'évolution de la méiose dans les basides de *Coprinus congregatus*, dans le cas où la phase photo-stimulée de précaryogamie est retardée par une période obscure surnuméraire de 48 heures.

Remarque : Ces observations démontrent que l'induction de la méiose est ici strictement photodépendante : si les ébauches au stade - 48h ne sont pas éclairées la caryogamie n'a pas lieu. Pour que celle-ci soit initiée une période lumineuse d'au plus 12 heures est nécessaire.

sporées et contrairement à celles généralement uninucléées de la majorité des Agaricales leucosporées (KUHNER 1926; YEN 1949).

Au stade 0h, les spores peuvent se détacher des lames hyméniales, en relation avec l'ouverture et la liquéfaction progressive du chapeau.

**Remarque :** On sait (cf. introduction) que la morphogenèse des carpophores et la sporogenèse peuvent se dérouler normalement sous éclairément ininterrompu, à 25°C, quand les cultures subissent un obscurcissement convenable, par exemple 12 heures d'obscurité après 3,5 jours d'illumination (fig. 6). On verra ci-après que la caryogamie et les autres étapes de la méiose se produisent de manière sensiblement similaire. Toutefois, au « stade de sensibilité à l'obscurité » ainsi obtenu sous éclairément ininterrompu, un certain nombre de basides présentent un noyau de fusion, pratiquement jamais observé au stade — 36h, sous régime 12.12.

## 2) INFLUENCE DE LA LUMIERE ET DE L'OBSCURITÉ SUR LE DÉCLENCHÉMENT DE LA CARYOGAMIE DE PRIMORDIUMS N'AYANT PAS ATTEINT LE STADE DE SENSIBILITÉ A L'OBSCURITÉ (Fig. 3).

Après 3 jours sous régime photopériodique (L,O : 12,12), les primordiums sont généralement au stade — 48h, ce stade étant évidemment observé en début de photopériode. Tout comme au stade — 36h ultérieur (stade de sensibilité à l'obscurité), les cellules hyméniales présentent uniquement des jeunes basides binucléées. Nous savons de longue date, que, au stade — 48h, les primordiums n'ont pas encore atteint le stade de sensibilité à l'obscurité : un éclairément complémentaire reste indispensable, une photopériode d'une durée de 12 heures convenant (MANACHERE 1967). L'obscurcissement de cultures porteuses d'ébauches de carpophores au stade — 48h (ou à des stades encore plus jeunes) détermine un allongement des stipes sans augmentation du diamètre de leur section et avec arrêt corrélatif de l'évolution des chapeaux. Si le séjour à l'obscurité persiste, les primordiums avortent sous une forme que nous qualifions d'étiolée, à pieds grêles et chapeaux punctiformes (MANACHERE 1967) - (Fig. 5 C).

Nous avons vérifié au plan cytologique, que indépendamment de l'étiollement des stipes, les cellules hyméniales n'évoluent pas et demeurent au stade binucléé, caractéristique du stade — 48h, tant que les ébauches de carpophores demeurent à l'obscurité. L'évolution cytologique des jeunes basides apparaît donc, en pratique, comme très intimement liée à l'évolution morphologique générale des chapeaux.

Mais, dans la mesure où les cultures sont de nouveau soumises au régime photopériodique de référence avant avortement des primordiums (par exemple après un séjour surnuméraire de 24 ou même 48 heures à l'obscurité, Fig. 3), non seulement la morphogenèse des carpophores reprend normalement, mais également le déroulement de la méiose et la sporogenèse consécutive. C'est-à-dire que, dès la reprise de l'éclairément, les noyaux des basides entrent dans une période d'activité méiotique visible : la chromatine s'organise, les chromosomes s'individualisent, 12 heures après la reprise de l'éclairément la caryogamie débute dans la population de basides. Le fait remarquable est que l'ensemble des événements, tant morphologique que cytologique, demeure « programmé » comme dans les témoins : le passage obscurité-lumière correspondant au stade

— 48h dans le cas normal (cultures témoins, cf. fig. 2) ou résultant d'un obscurcissement prolongé (cf. fig. 3) détermine l'épaississement des stipes, le développement morphologique des chapeaux, la méiose et la sporogénèse dans les délais analogues de 48 heures, sans différence notable. La seule variation étant dans le fait que les carpophores ayant séjourné excessivement à l'obscurité à compter du stade —48h présentent à leur base une pseudorhize, conséquence de leur étiolement en l'absence de lumière.

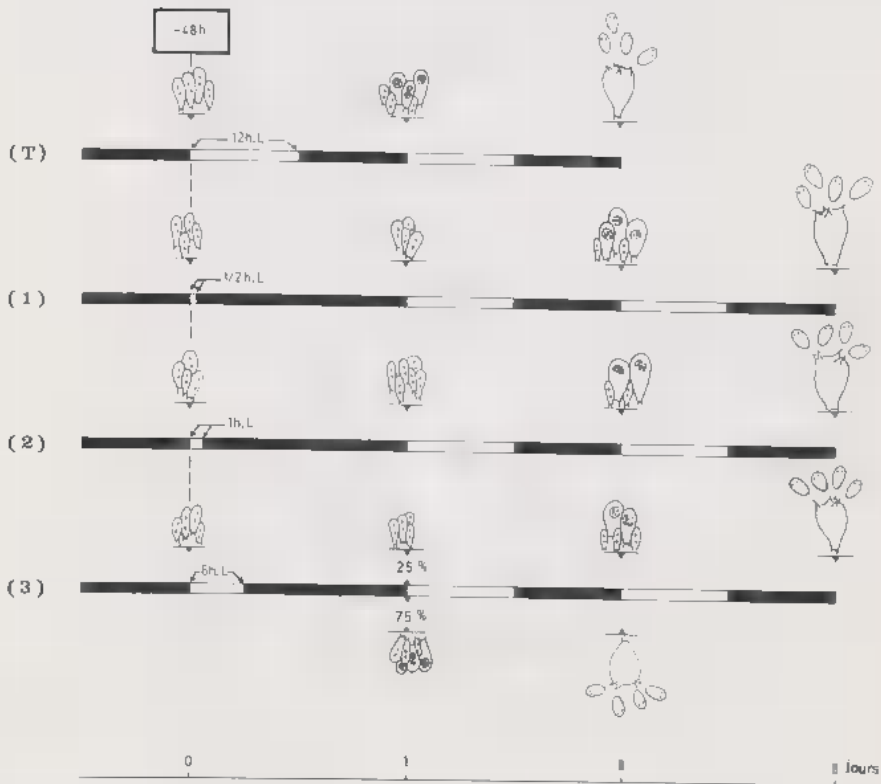


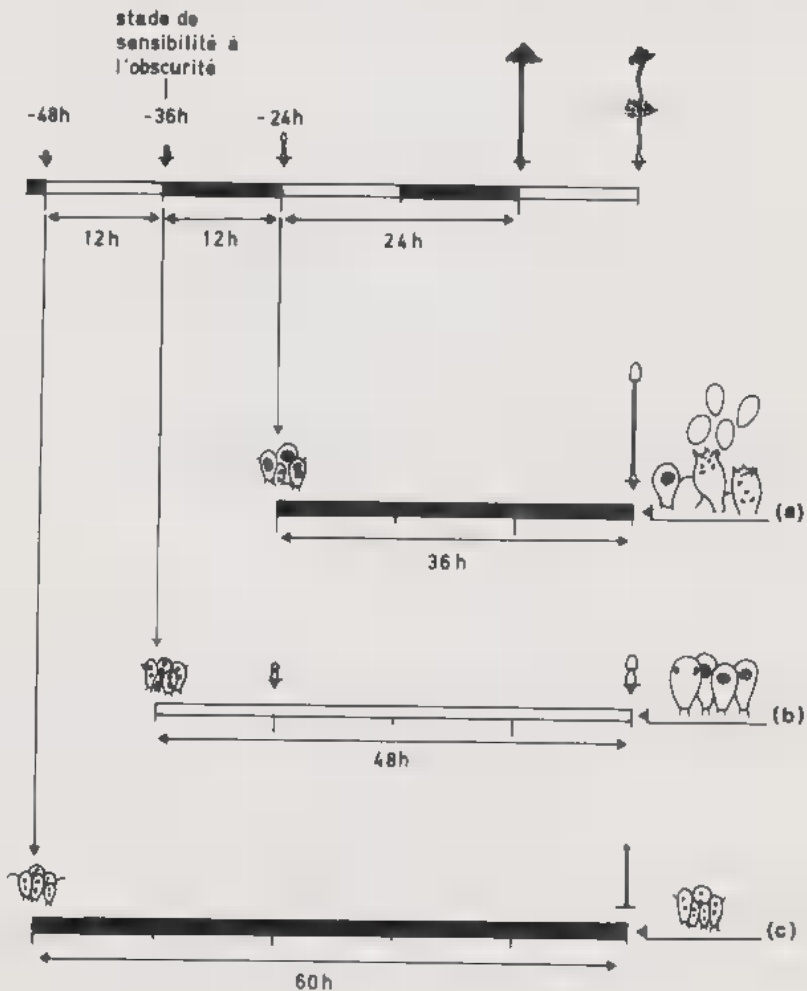
Fig. 4 : Essai d'évaluation de la durée minimale d'éclairement nécessaire à l'accomplissement de la phase photo-stimulée de précaryogamie : — 1/2 h et 1 h de lumière données au stade — 48h ne suffisent pas pour initier la caryogamie; — 6 h de lumière données au stade — 48h ne permettent pas à toutes les cultures l'initiation de la caryogamie.

Le problème se pose de savoir si la durée de l'étape de préfusion, qui ■ révèle être photodépendante, pourrait être réduite tout en permettant la caryogamie. Il a été établi (fig. 4) que 1/2 h et 1 h de lumière ne suffisent pas pour permettre la fusion nucléaire, tandis que 6 heures de lumière permettent à plus de la moitié des cultures de présenter des carpophores allant à terme dans un délai normal

(Fig. 4). Des études ultérieures devraient permettre de préciser les conditions d'éclaircissement permettant aux primordiums au stade - 48 h de franchir l'étape précédant la méiose, la caryogamie, en recherchant la durée de cette étape préméiotique photodépendante.

### 3) PERTURBATION DE LA MÉIOSE PAR NON-ACCOMPLISSEMENT DE LA «PHASE PHOTO-INHIBÉE». (Fig. 5 b).

La suppression de tout obscurcissement à compter du stade de sensibilité à l'obscurité, à 25°C, détermine un blocage morphogénétique caractéristique, et empêche en particulier l'allongement des pieds des carpophores ainsi que l'ouverture et l'autolyse des chapeaux. Au plan méiotique, cette perturbation



du régime photopériodique n'empêche pas en pratique la fusion nucléaire, ni ne semble la retarder (en effet après 4,5 jours de lumière continue pratiquement toutes les basides présentent un noyau de fusion). Toutefois, l'évolution de la méiose au-delà de la caryogamie est strictement dépendante de l'accomplissement de la phase photo-inhibée, fonction de l'obscurcissement nécessaire et suffisant usuellement subi par les cultures à compter du stade — 36h sous régime L,O : 12,12. La méthode des étalement utilisée sur des carpophores s'étant développés pendant 5 jours en lumière continue nous a permis de noter que la grande majorité des basides étaient bloquées en prophase I de la méiose, quelques unes - peu nombreuses - atteignent le stade métaphase I ou même la fin

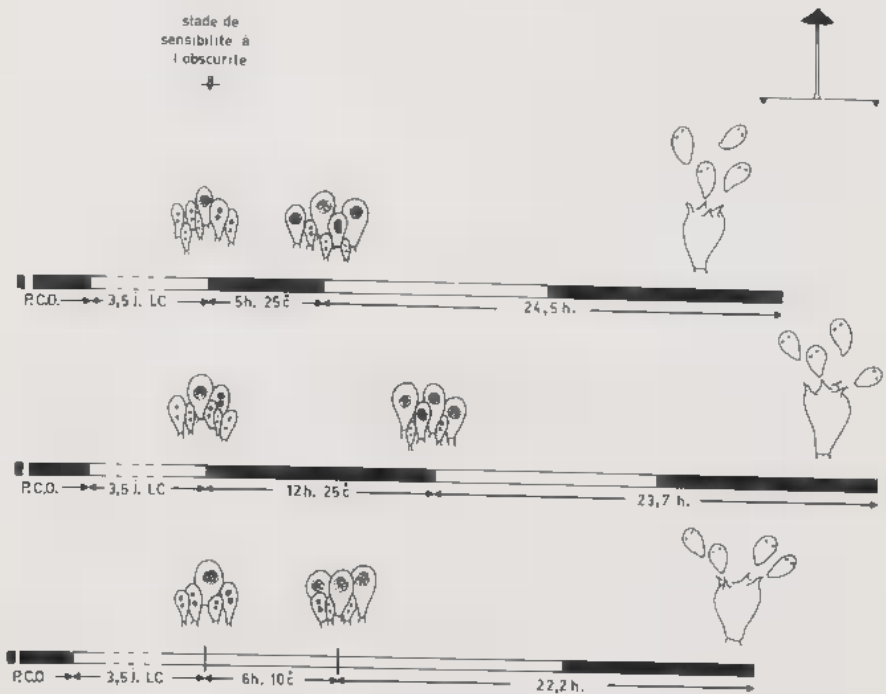


Fig. 5 : Influence des conditions d'éclairage sur la morphologie générale des carpophores de *Coprinus congregatus* et sur l'évolution cytologique corrélative des basides. (a) - Le non-accomplissement de la 2ème phase photo-stimulée entraîne une perturbation de l'achèvement de la méiose. (b) - Le non-accomplissement de la phase photo-inhibée aboutit à un blocage de la méiose ■ stade «noyau de fusion». (c) - Le non-accomplissement de la phase photo-stimulée de préfusion empêche l'induction de la caryogamie.

Fig. 6 : Étude comparée de l'évolution de la méiose à partir du stade de sensibilité à l'obscurité obtenu en LL (Lumière continue) : — suite à ■ scotophase réduite à 5 h à 25°C; — suite à une scotophase de 12 h à 25°C; — quand la scotophase est remplacée par un abaissement thermique, soit 6 h à 10°C.

de la première division méiotique, rarement la 2ème division (avec dans ce cas apparition des stérigmates).

#### 4) PERTURBATION DE LA MÉIOSE PAR NON-ACCOMPLISSEMENT DE LA «2ème PHASE PHOTO-STIMULÉE» (Fig. 1 a).

La suppression de tout éclairage à compter du stade - 24h, donc après accomplissement de la «phase photo-inhibée», conduit à l'avortement des carpophores sous une forme caractéristique à pied allongé et chapeau non ouvert et peu sporifère. Les hyméniums ainsi obtenus peuvent présenter, en proportions variables selon les cas, des basides à tous les stades possibles d'évolution (1 à 4 noyaux; stérigmates avec spores plus ou moins évoluées et très rarement nucléées).

On retiendra essentiellement que l'obscurité permettant l'accomplissement de la phase photo-inhibée du développement des carpophores permet à la fois le grand allongement terminal des pieds et l'évolution normale de la méiose au delà de la caryogamie. L'éclairage permettant l'accomplissement de la 2ème phase photo-stimulée conditionne à la fois l'achèvement de la méiose et la production de spores binucléées ainsi que l'ouverture et l'autolyse des chapeaux.

L'évolution cytologique des cellules hyméniales et l'évolution morphologique des carpophores sont donc déterminées corrélativement par les conditions d'éclairage.

#### 5) ÉTUDE COMPARATIVE DE L'INFLUENCE DE L'OBSCURITÉ ET D'UN ABAISSEMENT DE LA TEMPÉRATURE SUR LA MÉIOSE DE PRIMORDIUMS AYANT ATTEINT LE STADE DE SENSIBILITÉ A L'OBSCURITÉ (Fig. 6).

On sait que, au «stade de sensibilité à l'obscurité», la morphogénèse des carpophores se poursuit normalement dans la mesure où les cultures subissent soit un obscurcissement de durée convenable (5 heures, au minimum, à la température de 25°C) soit un abaissement thermique d'amplitude et de durée convenable (exemple : chute de 25 à 10°C pendant 6 heures au minimum). Suite à ce traitement inducteur, les cultures doivent être éclairées pour que s'accomplisse la 2ème phase photo-stimulée. Le stade de maturité (dit usuellement stade 0h à 25°C) étant observé environ 24 heures après la fin du traitement inducteur.

Au plan cytologique, on retiendra que les événements méiotiques et la sporogénèse corrélatrice se déroulent de manière sensiblement analogue, quels que soient les traitements inducteurs pratiqués dans les expériences rapportées ici, à savoir obscurcissement d'une durée de 5 à 12 heures, ou abaissement thermique de 25 à 10°C d'une durée de 6 heures. Dans les 3 cas envisagés l'évolution morphogénétique et l'évolution méiotique puis sporogénétique corrélatives restent indissociées et semblent relever des mêmes déterminismes.

## IV. — DISCUSSION

Les résultats rapportés ci-dessus confirment que l'évolution cytologique des hyméniums, du point de vue de la méiose et du point de vue de la sporogénèse consécutive est liée au développement général du chapeau. Toutefois, il ne nous semble pas possible, dans l'état actuel des données expérimentales, de préjuger des relations éventuelles de cause à effet entre les divers phénomènes simultanés ou consécutifs au cours de la morphogénèse des carpophores de *C. congregatus*. Ainsi, a-t-on pu noter, en particulier, que les relations temporelles des divers phénomènes morphologiques et cytologiques observés sous régime photopériodique L, O : 12, 12 semblent constantes et se retrouvent pratiquement inchangées, quand le développement des carpophores est artificiellement retardé mais non empêché de manière irréversible. C'est ainsi que le non achèvement de la 1<sup>ère</sup> phase photo-stimulée par un obscurcissement supplémentaire au stade - 48h conduit au maintien des jeunes basides au stade binucléé : en pratique, c'est l'ensemble du chapeau des primordiums qui demeure à un stade physiologique « - 48h » (Fig. 5 b). En effet, (Fig. 3) la reprise du régime photopériodique détermine une maturation normale des primordiums encore viables, ceci dans les 48 heures. Le fait que la fusion ne puisse avoir lieu si on garde à l'obscurité des cultures au stade - 48h, et que, par contre, 12 heures de lumière données à ces mêmes cultures permettent la caryogamie, prouve que la fusion nucléaire est précédée par une étape photo-dépendante, indispensable à l'initiation de la méiose. Plusieurs auteurs (ROSSEN et WESTERGAARD 1966 sur un discomycète *Neotiella rutilans* - LU 1975 sur *C. lagopus* - IYENGAR et al. 1977 sur *Neurospora crassa*) ont étudié par microspectrophotométrie et par des études cinétiques d'incorporation de <sup>32</sup>P l'évolution du taux d'ADN dans le noyau des basides, et montré que la phase S de réplication de l'ADN prémeiotique précédait la caryogamie. Chez *C. lagopus* (LU 1974 a et b) la lumière est nécessaire à la différenciation des cellules hyméniales conduisant à la méiose. Les 6-7 heures avant la caryogamie correspondent à une étape d'initiation de la méiose dont les 2 premières heures seraient sensibles à la température en lumière continue; l'inhibition de la caryogamie dans les conditions restrictives peut être levée par l'obscurité. Ce minimum de 2 heures correspondrait à l'initiation de tous les sites de réplication dans la population de basides (LU et JENG 1975). Notre matériel *C. congregatus* serait, lui, photo-dépendant pour cette période précaryotique - sans doute de réplication de l'ADN - pendant une durée qui reste à déterminer. Des études microspectrophotométriques seraient à conduire pour préciser les limites temporelles de cette réplication. Une fois la caryogamie accomplie, *C. congregatus* a besoin d'obscurité pour que le processus méiotique puisse continuer.

Le non-accomplissement de la phase photo-inhibée par excès d'éclairement permet la caryogamie mais bloque les basides au stade «noyau de fusion», dans des pourcentages variables selon la durée de l'éclairement surnuméraire au delà du stade - 36h. L'application d'un obscurcissement convenable, ou d'un refroidissement

dissement d'efficacité équivalente, lève l'état d'inhibition et rend possible la poursuite de la méiose au delà de la caryogamie, dans la mesure où la 2<sup>ème</sup> phase photo-stimulée peut s'accomplir : le non-accomplissement de cette dernière phase empêche non seulement l'ouverture et l'autolyse normales des chapeaux, mais également une sporogénèse et une sporulation abondantes, ceci en relation avec une méiose le plus souvent perturbée (Fig. 5).

Il convient de souligner que les perturbations diverses, dues soit à des éclairissements excessifs soit à des obscurissements excessifs se manifestent non seulement au niveau des chapeaux de *C. congregatus* (développement général; méiose; sporulation ...) mais atteignent aussi les stipes (Fig. 5) ... Le problème reste entier de savoir si la lumière, tant par excès que par défaut, agit de façon déterminante sur l'un des phénomènes observés pratiquement simultanément (épaississement et élongation des stipes; maturation générale des chapeaux; évolution méiotique ...). La reconnaissance d'un «phénomène clé», à supposer qu'elle soit possible, permettrait de progresser dans la connaissance des corrélations intervenant dans le contrôle de la morphogénèse et de la sporogénèse des carpophores des Basidiomycètes. On sait actuellement que si les stipes «transmettent» aux chapeaux des aliments provenant du substrat nutritif et du mycélium originel, leur élongation n'en est pas moins sous le contrôle de substances élaborées au niveau des lamelles hyméniales (BRET 1977 et cf. mise au point : MANACHERE et al. sous presse). D'autres travaux restent à accomplir pour répondre clairement à la question posée.

Quoiqu'il en soit, il apparaît particulièrement utile de connaître le déroulement des phénomènes méiotiques, parallèlement aux autres phénomènes physiologiques caractérisant la morphogénèse des carpophores de champignons supérieurs. Cette connaissance assurera, d'une part, une approche plus intime de cette morphogénèse, dont la méiose est partie intégrante, sinon déterminante, et, d'autre part, apportera, compte-tenu de la bonne synchronisation de l'évolution des cellules hyméniales des Coprins, d'excellents repères du degré d'évolution des carpophores, y compris sur le plan temporel.

L'étude comparative de l'influence de l'obscurité et d'un abaissement de température sur la méiose dont les principaux résultats sont rapportés au paragraphe III, 5 de cette publication découle de travaux de R. DURAND et J.C. ROBERT relatifs aux influences des interactions des facteurs «lumière» et «température» sur la fructification de *C. congregatus*. Nous les remercions très vivement pour leur étroite collaboration au cours de l'ensemble de nos expériences et pour leurs utiles suggestions pendant la rédaction de cet article.



## BIBLIOGRAPHIE

- BOIDIN J., 1954 — Étude biotaxinomique sur les Hydnés résupinés et les Corticiés. Étude spéciale du comportement nucléaire des mycéliums. Thèse, Fac. Sci. Lyon.
- BRET J.P., 1977 — Respective role of cap and mycelium on stipe elongation of *Coprinus congregatus*. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 68 : 363-369.
- DURAND R. et ROBERT J.C., 1980 — Interactions entre les facteurs lumière et température dans le contrôle de la morphogénèse des carpophores du champignon basidiomycète *Coprinus congregatus*. *Physiol. Vég.* 18 : 131-145.
- IYENGAR G.A.S., DEKA P.C., KUNDU S.C., SEN S.C., 1977 — DNA synthesis in course of meiotic development in *Neurospora crassa*. *Genet. Res.*, 29 : 1-8.
- KAMADA T., KURITA R. et TAKEMARU T., 1978 — Effects of light on basidiocarp maturation in *Coprinus macrorhizus*. *Plant Cell Physiol.* 19 : 263-275.
- KUHNER R., 1926 — Contribution à l'étude des Hyménomycètes et spécialement des Agaricacées. Thèse, Fac. Sci. Paris.
- LU B.C., 1967 — Meiosis in *Coprinus lagopus* : a comparative study with light and electron microscopy. *J. Cell Sci.* 2 : 529-536.
- LU B.C., 1972 — Dark dependence of meiosis at elevated temperature in the Basidiomycete *Coprinus lagopus*. *J. Bacteriol.* 111 : 833-834.
- LU B.C., 1974 a — Meiosis in *Coprinus* : V. The role of light on basidiocarp initiation, mitosis and hymenium differentiation in *Coprinus lagopus*. *Can. J. Bot.* 52 : 299-305.
- LU B.C., 1974 b — Meiosis in *Coprinus* : VI. The control of the initiation of meiosis. *Can. J. Gen. Cytol.* 16 : 155-164.
- LU B.C. and JENG D.Y., 1975 — Meiosis in *Coprinus* : VII. The prekaryogamy S-phase and the postkaryogamy DNA in *C. lagopus*. *J. Cell Sci.* 17 : 461-470.
- MANACHERE G., 1967 — Déroulement de la fructification de *Coprinus congregatus* Bull. ex Fr. en relation avec les conditions d'éclairement. *Bull. Soc. Mycol. Fr.* 83 : 257-285.
- MANACHERE G., 1968 — Influence des conditions d'éclairage sur le déroulement des phénomènes cytologiques au cours de la sporogénèse de *Coprinus congregatus* Bull. ex Fr. *C. R. Acad. Sci. Série D (Paris)* 267 : 2111-2114.
- MANACHERE G., 1970 — Recherches physiologiques sur la fructification de *Coprinus congregatus* Bull. ex Fr. : action de la lumière; rythme de production de carpophores. *Ann. Sci. Nat. Bot. et Biol. Vég. (Paris)* 12e série 11 : 1-95.
- MANACHERE G., 1978 — Morphogénèse des carpophores de Basidiomycètes supérieurs. *Rev. Mycol.* 42 : 191-252.
- MANACHERE G., 1980 — Conditions essential for controlled fruiting of macromycetes. A review. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 75 : 255-270.
- MANACHERE G., ROBERT J.C., DURAND R., BRET J.P., et FEVRE M. (sous presse) — Differentiation in the Basidiomycetes. Chap. 16, in *Fungal differentiation : A contemporary synthesis*, J.E. SMITH éd., Marcel Dekker Inc., New York.
- ROBERT J.C., 1971 — Effet favorable d'une période froide sur la maturation de carpophores de *Coprinus congregatus* Bull. ex Fr. inhibés par un éclairage continu. *C. R. Acad. Sci. Série D (Paris)* 273 : 154-157.
- ROBERT J.C. et DURAND R., 1979 — Light and temperature requirements during fruit-body development of a basidiomycete mushroom, *Coprinus congregatus*. *Physiol. Plant.* 46 : 174-178.

- ROSSEN J.M. and WESTERGAARD M., 1966 — Studies on the mechanism of crossing-over. II. Meiosis and time of meiotic chromosome replication in the Ascomycete *Neotitella rutilans* (Fr.) Dennis. *Compt. Rend. Trav. Lab. Carlsberg*. 35 : 233-260. (Cités dans ZICKLER D., 1973).
- YEN H.C., 1949 — Contribution à l'étude de la sexualité et du mycélium des Basidiomycètes saprophytes. Thèse Sci. Lyon. *Ann. Univ. Lyon, section C* 6 : 5-157.
- ZICKLER D., 1973 — La méiose et les mitoses au cours du cycle de quelques Ascomycètes. Thèse Sc. Paris-Sud, Centre d'Orsay.